

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17701

研究課題名(和文) 繊毛運動を支える組みひも状アクチンナノブレイドの機能構造解析

研究課題名(英文) Analysis of structure and function of actin bundle in the motile ciliated cells

研究代表者

篠原 恭介 (Shinohara, Kyosuke)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：20527387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では繊毛運動不全症の原因と考えられているDpcd遺伝子の機能を明らかにした。遺伝子改変マウスと精製蛋白質を用いた試験管内の実験からDpcdは繊毛細胞表層のアクチン束ネットワークを形成する事とこのアクチン束ネットワークが繊毛の成熟に必要な事であることを明らかにした。さらにDpcdがレドックス環境に応じて活性を変化させる性質を持つ事を見出した。アクチン束ネットワークが具体的にどのような役割を担い繊毛を成熟させるかについては今後の研究により追及していく必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の成果により劣性の遺伝子性疾患である原発性繊毛運動不全症の発症メカニズムの一端が明らかとなった。また根本的な治療法のない疾患への治療戦略を考える上で情報を提供する。また、まだ未解明の事が多い繊毛の生物学、特に細胞骨格と繊毛の関係性を考えていく上で本研究成果は新しい知見をもたらす今後のこの分野の方向性(アクチン骨格と繊毛)に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this project, we have examined function of Dpcd protein in the mouse motile ciliated cells. Using mouse molecular genetics and in vitro reconstitutions, we have found that Dpcd organizes actin network that is involved in maturation of the mouse motile cilia. Further, Dpcd is an actin bundling protein in redox-dependent manner.

研究分野：細胞生物学

キーワード：繊毛 細胞骨格 アクチン

1. 研究開始当初の背景

ヒトの体はあらゆる組織に繊毛と呼ばれる細胞表面から突き出た構造を持つ細胞を持つ。繊毛には光や化学物質を感じるセンサーとして働く一次繊毛と、動く事で細胞外に水の流れを発生し体の恒常性に寄与する運動繊毛の2種類がある。後者の運動繊毛は気管・卵管・精巣・脳室・初期胚などにあり、先天的に繊毛運動に異常がある患者では呼吸器不全・不妊・内臓逆位などを発症する。繊毛研究は医学的に重要となる。動く繊毛の根元には細胞骨格のネットワークが存在する。繊毛根元の規則的なアクチンを薬理的に壊すと正常に繊毛が成熟しない事が先行研究により報告されており、アクチン繊維ネットワークの重要性が知られている [Pan *et al* *J. Cell Sci.* (2007)]。一方でどのような分子がこのネットワーク構造の形成に必要なかについては理解が進んでいなかった。

2. 研究の目的

本研究課題では、申請者が同定したアクチン束化蛋白 *Dpcd* の解析を通じて繊毛形成に必須なアクチン束ネットワークの形成原理を明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

[1] 野生型マウスと *Dpcd* 遺伝子欠損マウスの気管繊毛細胞における繊毛根元のアクチンの分布を免疫染色により詳しく観察した。また、*Dpcd* 蛋白の気管細胞内局在を免疫染色により観察した。

[2] 走査型電子顕微鏡観察と透過型電子顕微鏡観察により *Dpcd* 遺伝子欠損マウスの気管繊毛細胞の異常を詳しく観察した。

[3] 試験管内再構成系により *Dpcd* によるアクチン束化の原理を解析した。*Dpcd* のリジン残基に蛍光分子 *Bodipy* を付加しラベル化を行った。アクチン束における *Dpcd* の結合様式を蛍光観察により確認した。

4. 研究成果

[1] 気管細胞におけるアクチンの分布

野生型マウス気管細胞では、繊毛根元に格子状のアクチンのネットワーク構造が観察され繊毛はそれらの格子の隙間から形成していた。一方で *Dpcd* 遺伝子欠損マウスでは、規則正しい構造が観察されずにアクチン繊維が細胞全体へ拡散していた。*Dpcd* は繊毛根元でアクチンを束化しネットワークを形成する事が示唆される。また、*Dpcd* 蛋白の気管細胞内における局在を免疫染色により観察したところ、*Dpcd* は繊毛根元のアクチンネットワークと共局在している事が分かった。局在のパターンとして、アクチン束の上にドット状に局在するパターンとアクチン束を覆うように局在するパターンの2種類が観察された。気管繊毛細胞の分化の段階に依存して *Dpcd* の局在が少し異なる可能性があるが、実験の手技による影響の有無も含めて今後慎重に検討すべき点である。

[2] 電子顕微鏡観察

Dpcd 遺伝子欠損マウスの気管繊毛細胞の異常を詳しく観察した。その結果、*Dpcd* 遺伝子欠損マウスでは、気管繊毛の本数と長さが野生型マウスの細胞に比べて減少する事を観察した。また、透過型電子顕微鏡観察から *Dpcd* 遺伝子欠損マウスの気管繊毛では根元の基底小体とよばれる繊毛の鋳型となる構造がアピカル膜表面にドッキングしない・方向性が逆になる、といった異常が観察された。この事から根元のアクチンネットワークが無い事により繊毛が正常な位置を保てず形成に影響が出る事が示唆された。

[3] 試験管内再構成系により *Dpcd* によるアクチン束化の原理の解析

大腸菌組み換え体により精製した *Dpcd* 蛋白とアクチン繊維を加えると多数のアクチン束が試験管内に観察された。また、この束化活性は酸化的環境下(過酸化水素存在下)で増強し、還元環境下(DTT存在下)で失活する事が観察された。*Dpcd* の中央コア領域とC末端の計3つのシステインを介した分子間ジスルフィド結合で形成される2量体がアクチン束化を担う事が示唆される。今後アクチン束化の構造基盤を明らかにするうえで指針を立てる事ができた。また、蛍光分子 *Bodipy* をラベルした *Dpcd* とローダミンファロイジンでラベルしたアクチン繊維の相互作用を蛍光観察により確認したところ、*Dpcd* はアクチン

束上にドット状に結合している事が観察された。今後超解像度顕微鏡により、Dpcdが結合する部位における規則性の有無を検証していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 篠原恭介
2. 発表標題 Primary Ciliary Dyskinesia protein Dpcd forms barrier that regulates transport between cilia and cytoplasm by electrostatic actin bundling
3. 学会等名 EMBO Workshop Cilia 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澤田麻里
2. 発表標題 原発性繊毛運動不全症の原因遺伝子Dpcdの機能解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考